



(19) **RU** <sup>(11)</sup> **2 054 486** <sup>(13)</sup> **C1**  
(51) МПК<sup>6</sup> **C 12 Q 1/04**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО  
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

(21), (22) Заявка: 5061195/13, 01.09.1992

(46) Дата публикации: 20.02.1996

(56) Ссылки: 1. Владимиров Ю.А. Фотохимия и люминесценция белков. М.: Наука, 1965. 2. Конев С.В., Вологовский И.Д. Фитобиология, Минск, БГУ, 1974. 3. Карнаузов В.Н. Люминесцентный спектральный анализ клетки. М.: Наука, 1978. 4. Ломов Ю.М., Голубкова Л.А. Способ дифференциации R-ферм холерных вибрионов от L-форм и их ревертантов. Авторское свидетельство СССР N 1198952, кл. C 12Q 1/20, C 12Q 1/04, 1988.

(71) Заявитель:  
Петухов Валерий Георгиевич

(72) Изобретатель: Петухов Валерий Георгиевич

(73) Патентообладатель:  
Петухов Валерий Георгиевич

**(54) СПОСОБ ИДЕНТИФИКАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ**

(57) Реферат:

Использование: изобретение относится к микробиологии, медицине, пищевой промышленности и может быть использовано для быстрой идентификации микроорганизмов. Сущность изобретения:

удалось получить спектры флуоресценции клеточных компонентов микробных клеток, измеряя спектры не обычной, а замедленной (или длительной) флуоресценции и фосфоресценции при комнатной температуре. 1 ил., 1 табл.

RU 2 054 486 C1

RU 2 054 486 C1



(19) **RU** <sup>(11)</sup> **2 054 486** <sup>(13)</sup> **C1**  
(51) Int. Cl.<sup>6</sup> **C 12 Q 1/04**

RUSSIAN AGENCY  
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 5061195/13, 01.09.1992

(46) Date of publication: 20.02.1996

(71) Applicant:  
Petukhov Valerij Georgievich

(72) Inventor: Petukhov Valerij Georgievich

(73) Proprietor:  
Petukhov Valerij Georgievich

(54) **METHOD OF MICROORGANISM IDENTIFICATION**

(57) Abstract:

FIELD: microbiology. SUBSTANCE:  
fluorescence spectra of cellular components  
of microbe cells were obtained by measuring

delayed (or prolonged) fluorescence and  
phosphorescence at the room temperature  
rather than conventional ones. EFFECT:  
improved method of identification. 1 dwg, 1 tbl

RU 2 054 486 C1

RU 2 054 486 C1

Изобретение относится к микробиологии, медицине, пищевой промышленности и может быть использовано для быстрой идентификации микроорганизмов.

Известны спектры люминесценции, флуоресценции и низкотемпературной (обычно при минус 196°C) фосфоресценции различных биологических объектов, в том числе микроорганизмов [1, 2, 3]. Эти спектры возбуждаются в УФ-области и принадлежат клеточным белкам. Попытки использовать эти спектры для целей различения различных микроорганизмов были неудачны, так как белки имеют одинаковый спектр практически у всех биологических объектов. Попытки же получить спектры флуоресценции других клеточных компонентов микробных клеток были безуспешны из-за сильного маскирующего эффекта мутности этих объектов.

Ближайшим аналогом изобретения является способ дифференциации R-форм холерных вибрионов от L-форм и их ревертантов [4] в котором микробную взвесь облучали ультрафиолетовым светом длиной волны 365 нм и регистрировали интегральную интенсивность обычной флуоресценции.

В предлагаемом способе измеряются спектры люминесценции микроорганизмов, но не "обычной", а замедленной (или длительной) флуоресценции и фосфоресценции при комнатной температуре.

Идентификация по предлагаемому способу осуществляется путем измерения спектров длительной люминесценции (фосфоресценции и замедленной флуоресценции) микроорганизмов при комнатной температуре (или температуре их жизнедеятельности) при возбуждении в видимой и (или) ультрафиолетовой областях спектра и определения положения максимумов интенсивностей длительной люминесценции и их соотношения при различных длинах волн, например в различных максимумах люминесценции внутриклеточных металлопорфиринов и (или) белков и других соединений. Набор таких максимумов и отношений является характерным для тех или иных микроорганизмов.

Способ осуществляется следующим образом.

Культуру микроорганизмов, выращенную на твердой или жидкой питательной среде, наливают в кювету и помещают в фосфориметрическую установку для измерения спектров длительной люминесценции. Установка состоит из источника возбуждающего света (ультрафиолетовой лампы или лампы накаливания, или лазерного источника в УФ-или видимой области), устройства для выделения соответствующего спектра возбуждающего света (светофильтры или монохроматор), фосфороскопа (устройства для разделения во времени возбуждающего света и света люминесценции со временем порядка 0,01-0,001 с), устройства для разложения люминесценции объекта в спектр (система светофильтров или монохроматор), приемника излучения, например фотоумножителя, устройства для усиления и регистрации фототока и записывающего устройства.

Для живых клеток микроорганизмов в

среде должен находиться питательный субстрат, например 1%-ная глюкоза; если клетки мало или нежизнеспособны, то из кюветы следует удалить кислород либо путем вакуумной откачки, либо путем продувания через кювету газа, не содержащего кислород, например химически чистого азота.

Полученные спектры микроорганизмов имеют несколько максимумов, например при возбуждении в области 250-300 нм имеется максимум около 340 нм, принадлежащий белкам клеток; при возбуждении в области 400-560 нм имеются три максимума около 580 нм, 600 нм и 700 нм, принадлежащие металлопорфиринам клеток (обычно цинк-порфиринам); при возбуждении в области 300-400 нм имеется максимум в области 540-550 нм. Соотношение интенсивностей в этих максимумах для разных микроорганизмов различное, что позволяет их идентифицировать по этим параметрам.

На чертеже приведены спектры длительной люминесценции бактерий *E. Coli* M-17 (кривая А) и *M. tuberculosis* (кривая Б), при возбуждении видимым светом при комнатной температуре. Ось абсцисс длина волны, нм. Ось ординат интенсивность люминесценции, отн.ед.

Пример. Бактерии кишечной палочки *E. Coli* штамм M-17 выращивают в чашках Петри на твердой питательной среде мясопептонном агаре Хоттингера в течение 24 ч. По окончании этого времени клетки смывают физиологическим раствором, отмывают от питательной среды центрифугированием при 8 тыс. об/мин в течение 10 мин и ресуспендируют в свежем физиологическом растворе до концентрации 10 млрд./мл с добавлением глюкозы до конечной концентрации 1%. Бактерии *M. Tuberculosis* (БЦЖ) выращивают на соответствующей твердой питательной среде, после выращивания клетки также отмывают и доводят оптическую плотность в кювете с длиной оптического пути 1 см до 10 ед. мутности по Международному стандарту мутности. Суспензии наливают в кювету из поликарбоната и помещают в фосфороскоп. Источником света служит лампа накаливания мощностью 150 Вт. Люминесценцию возбуждают в области 400-550 нм. Спектры длительной люминесценции получают с помощью монохроматора в области 550-750 нм и регистрируют с помощью фотоумножителя типа ФЭУ-79. Полученные спектры замедленной флуоресценции и фосфоресценции представлены на чертеже, результаты измерений представлены в таблице.

Как видно из данных таблицы, спектры замедленной флуоресценции и фосфоресценции при комнатной температуре отличаются по своим параметрам для бактерий *E. Coli* M-17 и *M. tuberculosis*, что позволяет их различать.

#### Формула изобретения:

СПОСОБ ИДЕНТИФИКАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ, включающий облучение микробной взвеси светом с последующей регистрацией их люминесценции, отличающийся тем, что микроорганизмы облучают видимым или/и ультрафиолетовым светом в диапазоне 250 - 600 нм, регистрируют спектры длительной

люминесценции (замедленной флуоресценции и фосфоресценции) при комнатной температуре в диапазоне 300 - 800 нм, определяют положение максимумов и

соотношение интенсивностей этой люминесценции в различных максимумах и по набору этих величин идентифицируют микроорганизмы.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

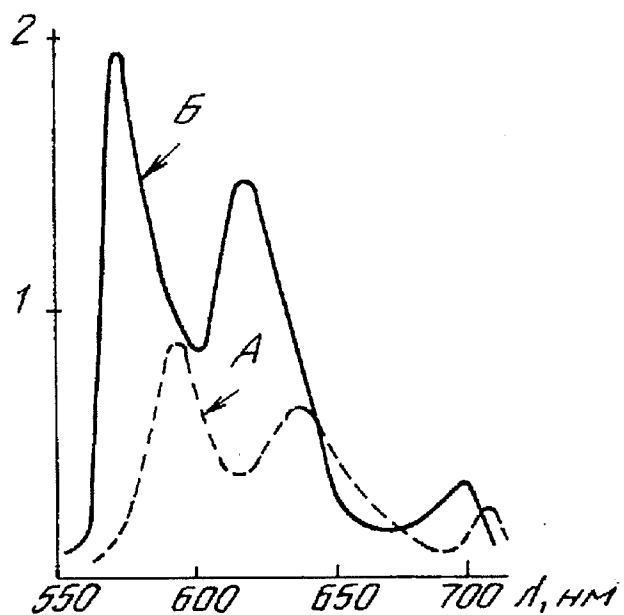
55

60

RU 2054486 C1

RU 2054486 C1

| Микроорганизмы  | Максимумы, нм |     |     | Отношения интенсивностей |           |           |
|-----------------|---------------|-----|-----|--------------------------|-----------|-----------|
|                 | 1-й           | 2-й | 3-й | $I_1$                    | $I_2/I_1$ | $I_3/I_1$ |
| M. tuberculosis | 585           | 625 | 700 | 1                        | 0,782     | 0,223     |
| E. Coli M-14    | 595           | 640 | 715 | 1                        | 0,751     | 0,375     |



RU 2054486 C1

RU 2054486 C1